



DE 197 22 888 A 1

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 197 22 888 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 07 K 16/00**  
A 61 K 39/395  
C 12 N 5/18  
C 12 P 21/08

②1 Aktenzeichen: 197 22 888.7  
②2 Anmeldetag: 28. 5. 97  
④3 Offenlegungstag: 3. 12. 98

<p>⑦1 Anmelder: Hünig, Thomas, Prof. Dr., 97078 Würzburg, DE</p> <p>⑦4 Vertreter: Dres. Fitzner, Münch &amp; Jungblut, Rechts- und Patentanwälte Ratingen-Berlin, 10115 Berlin</p>	<p>⑦2 Erfinder: Hünig, Thomas, Prof. Dr., 97078 Würzburg, DE; Tacke, Michael, Dr., 82377 Penzberg, DE; Hanke, Thomas, Dr., Berkeley, Calif., US; Hanke, Gabriele, Dr., Berkeley, Calif., US; Rodriguez-Palmero, Marta, Dipl.-pharm., 97082 Würzburg, DE</p> <p>⑤6 Entgegenhaltungen: Eur. J. Immunol., 1997, 27, S. 239-247; J. Immunol. 1995, 154, S.5121-5127;</p>
--	--

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤4 Human-CD28 spezifische monoklonale Antikörper zur antigenunspezifischen Aktivierung von T-Lymphozyten
- ⑤7 Die Erfindung lehrt humanverträgliche monoklonale Antikörper, welche gegen Human-CD28 spezifisch sind und Human-T-Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der Human-T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktivieren.

DE 197 22 888 A 1

Die Erfindung betrifft monoklonale Antikörper, welche für Human-CD28 spezifisch sind und T-Lymphozyten ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktivieren. Hybridomzellen zur Herstellung solcher Antikörper, ein Verfahren zur Herstellung solcher Antikörper sowie Verwendungen solcher Antikörper. – Als monoklonale Antikörper sind Antikörper bezeichnet, die von Hybrid-Zelllinien (sog. Hybridomen) produziert werden, die durch Fusion einer Antikörper produzierenden B-Zelle tierischer oder menschlicher Herkunft mit einer geeigneten Myelom Tumorzelle entstanden sind. Als CD28 wird ein auf T-Lymphozyten menschlicher und tierischer Herkunft exprimiertes Zelloberflächenmolekül bekannter Aminosäuresequenz bezeichnet, dem im Rahmen der internationalen "Human Leukocyte Typing Workshops" das Kürzel CD28 gegeben wurde. Mit Aktivierung von T-Lymphozyten ist die Vermehrung der Stoffwechselaktivität, Vergrößerung des Zellvolumens, Synthese immunologisch wichtiger Moleküle und Eintritt in die Zellteilung (Proliferation) von T-Lymphozyten auf einen äußeren Reiz hin gemeint. Beispielsweise werden diese Vorgänge durch Besetzung des CD28-Moleküls auf T-Zellen durch besondere CD28-spezifische monoklonale Antikörper ausgelöst. Die Aktivierung von T-Lymphozyten mit den beschriebenen Begleiterscheinungen ist Teil der physiologischen Immunreaktion, kann dort aber in pathologischen Situationen außer Kontrolle geraten (lymphoproliferative Erkrankungen), oder unzureichend sein (Immundefizienz).

Zum Verständnis der Erfindung ist zunächst folgender technologischer Hintergrund wichtig. Die Aktivierung ruhender T-Zellen zur Proliferation und funktionellen Differenzierung erfordert zunächst die Besetzung zweier Oberflächenstrukturen, sogenannter Rezeptoren: 1. des Antigenrezeptors, der von Zelle zu Zelle eine unterschiedliche Spezifität besitzt und für die Erkennung von Antigenen, z. B. viralen Spaltprodukten, notwendig ist; sowie des auf allen ruhenden T-Zellen gleichermaßen exprimierten CD28 Moleküls, welches natürlicherweise an Liganden auf der Oberfläche anderer Zellen des Immunsystems bindet. Man spricht von der "Kostimulation" der antigenspezifischen Immunreaktion durch CD28. In Zellkultur können diese Vorgänge nachgestellt werden durch Besetzung des Antigenrezeptors sowie des CD28-Moleküls mit geeigneten monoklonalen Antikörpern. Im klassischen System der Kostimulation führt weder die Besetzung des Antigenrezeptors noch die des CD28-Moleküls allein zur T-Zellproliferation, die Besetzung beider Rezeptoren ist jedoch effektiv. Diese Beobachtung wurde an T-Zellen des Menschen, der Maus und der Ratte gemacht.

Monoklonale Antikörper der eingangs genannten Art sind bekannt. Eine "direkte", d. h. von der Besetzung des Antigenrezeptors unabhängige Aktivierung ruhender T-Lymphozyten durch CD28-spezifische monoklonale Antikörper, wurde in folgenden Systemen beobachtet: in der Literaturstelle Brinkmann et al., J. Immunology, 1996, 156: 4100–4106 wurde gezeigt, daß ein sehr kleiner Anteil (5%) menschlicher T-Lymphozyten, die den für ruhende T-Lymphozyten typischen Oberflächenmarker CD45 RO tragen, durch den "klassischen" CD28-spezifischen monoklonalen Antikörper 9.3 bei Zusatz des Wachstumsfaktors Interleukin-2 (IL-2) ohne Besetzung des Antigenrezeptors aktiviert wird. In der Arbeit von Siefken et al., Cellular Immunology, 1997, 176: 59–65, wurde gezeigt, daß ein auf konventionellem Wege, d. h. durch Immunisierung von Mäusen mit menschlichen T-Zellen, hergestellter CD28-spezifischer monoklonaler Antikörper in Zellkultur eine Untergruppe

menschlicher T-Zellen ohne Besetzung des Antigenrezeptors zur Proliferation aktivieren kann, wenn CD28 durch diesen monoklonalen Antikörper besetzt wird und die zellgebundenen monoklonale Antikörpermoleküle zusätzlich durch weitere Antikörper miteinander vernetzt werden. In beiden Fällen sind die beschriebenen Antikörper zunächst grundsätzlich nicht zum Einsatz in der Humanmedizin geeignet, da es sich um Maus Antikörper handelt. Weiterhin ist beiden beschriebenen Antikörpern gemeinsam, daß nur ein sehr kleiner Anteil der T-Zellen "direkt" aktivierbar ist.

In der Arbeit von Tacke et al., Eur. J. Immunol., 1997, 27: 239–247 wurden zwei Arten von CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpern mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften beschrieben: "klassische Antikörper", die die Aktivierung ruhender T-Zellen nur bei gleichzeitiger Besetzung des Antigenrezeptors kostimulieren; und "direkte", die ohne Besetzung des Antigenrezeptors T-Lymphozyten aller Klassen in vitro und im Versuchstier zur Proliferation aktivieren können. Beide insofern bekannte monoklonale Antikörper rühren aus einer Immunisierung mit Zellen, auf denen Ratten-CD28 exprimiert ist und sind durch auf ihre jeweiligen beschriebenen Eigenschaften gerichtete unterschiedlichen Selektionen erhältlich. Ferner wird in dieser Literaturstelle gezeigt, daß CD28-spezifische monoklonale Antikörper, die den direkt aktivierenden Effekt besitzen, viel langsamer als klassische CD28-spezifische monoklonale Antikörper an T-Lymphozyten binden; die Bindung an eine Mausfibroblasten-Zelllinie (L-929), an deren Oberfläche das CD28-Molekül künstlich durch Transfektion exprimiert wird, erfolgt jedoch für klassische und "direkt" stimulierende CD28-spezifische monoklonale Antikörper mit der gleichen Geschwindigkeit. Daraus wird gefolgert, daß die insofern bekannten "direkt" stimulierenden CD28-spezifischen monoklonalen Antikörper eine aktive Form des CD28-Moleküls erkennen, deren Vorliegen auf ruhenden T-Zellen durch einen bisher unbekannten Mechanismus unterdrückt wird, die aber bei Expression des Moleküls in nicht-T Tumorzelllinien zugänglich ist. Die insofern bekannten monoklonalen Antikörper sind jedoch einerseits gegen Ratten-CD28 spezifisch und andererseits Maus-Antikörper. Sie eignen sich daher aus beiden Gründen nicht für therapeutische Zwecke beim Menschen.

Gegenüber dem Stand der Technik gemäß der beiden erstgenannten Literaturstellen liegt der Erfindung das technische Problem zugrunde, "direkte" Human-CD28 spezifische monoklonale Antikörper zur Verfügung zu stellen, die zum einen auch humanverträglich sind und die zum anderen Human-T-Zellen in breitem Umfang zu aktivieren vermögen.

Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfindung humanverträgliche monoklonale Antikörper, welche für Human-CD28 spezifisch sind und Human-T-Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der Human-T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktivieren, vorzugsweise mit humanen konstanten Komponenten. – Konstante Komponenten eines Antikörpers sind Bereiche, die nicht für die Antigenerkennung bedeutsam sind, im Gegensatz zu den variablen Bereichen, die die Antigenspezifität eines Antikörpers definieren. Konstante Komponenten unterscheiden sich jedoch bei Antikörpern verschiedener Arten und folglich auch Tieren und Menschen. Die konstanten Bereiche eines Antikörpers müssen jenen von Antikörpern eines Organismus entsprechen, der mit den Antikörpern behandelt werden soll, um verträglich zu sein. Erfindungsgemäße monoklonale Antikörper sind daher einerseits humanverträglich, sei es per se oder durch Humanisierung und können andererseits zur Behandlung verschiedener Krankheiten, die auf zu geringer T-Lymphozyten-Aktivität beruhen, dienen, da die Antikörper ge-

gen Human-CD28 spezifisch sind und da die Aktivierung der T-Lymphozyten umfassend ist.

Unter die Erfindung fallen selbstverständlich verschiedenste Derivate von monoklonalen Antikörpern, sofern die beanspruchten Merkmale erfüllt sind. Unter Derivaten von monoklonalen Antikörpern sind Modifikationen des monoklonalen Antikörpers zu verstehen, die durch übliche biochemische oder gentechnische Manipulationen erzeugt wurden. Dies ist beispielsweise gegeben mit der Humanisierung eines monoklonalen Antikörpers der Maus durch partiellen Ersatz struktureller (konstanter) Komponenten des Maus-Antikörpers durch solche eines menschlichen.

Im einzelnen sind erfindungsgemäße monoklonale Antikörper erhältlich durch: A) Herstellung von zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörpern befähigten Hybridomzellen im Wege einer Immunisierung mit nicht-T-Tumorzelllinien, auf welchen Human-CD28 exprimiert ist, B) ggf. Humanisierung der aus Hybridomzellen gemäß Stufe A erhältlichen monoklonalen Tier-Antikörper durch biochemischen oder gentechnologischen Austausch konstanter Komponenten der Tierantikörper gegen analoge konstante Komponenten eines menschlichen Antikörpers bzw. Austausch den Komponenten entsprechender Gene der Hybridomzellen, C) Sezernierung der Antikörper in Hybridomzell-Kulturen und Isolierung der Antikörper daraus oder Produktion der Antikörper durch Injektion der Hybridomzellen in Tiere, beispielsweise Mäuse, und Isolierung der Antikörper aus der Körperflüssigkeit der Tiere. – Der Kern der Erfindung besteht gegenüber den nächstliegenden Literaturstellen Brinkmann et al., J. Immunology, 1996, 156: 4100–4106, und Siefken et al., Cellular Immunology, 1997, 176: 59–65, demnach in der Erkenntnis, daß eine "direkte" Aktivierung praktisch aller T-Lymphozyten dann erreichbar ist, wenn die monoklonalen Antikörper durch Immunisierung mit nicht-T Tumorzellen, auf welchen Human-CD28 exprimiert ist, erhalten sind, anstelle einer Immunisierung mit T-Zelllinien. Denn so können monoklonale Antikörper erhalten werden, die nicht nur gegen Human-CD28 spezifisch sind, sondern auch eine "direkte" Aktivierung in beachtlichem Umfang bewirken. Im einzelnen weisen erfindungsgemäße monoklonale Antikörper Spezifität für Determinanten des menschlichen CD28-Moleküls auf, die auf dem natürlicherweise exprimierten CD28-Molekül schwer zugänglich sind und deren Besetzung durch die neuartigen monoklonale Antikörper zur Aktivierung der T-Zellen führt. Unter einer Determinante ist der Bereich eines Moleküls zu verstehen, der durch die Bindungsspezifität eines oder mehrerer Antikörper definiert wird.

Die grundsätzliche Vorgehensweise bei der Herstellung von Hybridomzellen, bei der Humanisierung sowie bei der Produktion der monoklonalen Antikörper aus (humanisierten) Hybridomzellen ist dem Fachmann gut vertraut und braucht hier nicht näher erläutert zu werden. Grundsätzlich sind alle insbesondere für die Herstellung der Hybridomzellen üblichen, bekannten und frei verfügbaren Zelllinien einsetzbar. Zur Herstellung der monoklonalen Antikörper kommt grundsätzlich neben der folgend beschriebenen Vorgehensweise die dem Fachmann im Detail gut geläufige rekombinante Expression in Frage.

Im einzelnen ist es bevorzugt, wenn die zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörper befähigten Hybridomzellen erhältlich sind durch a) Schaffung eines Plasmids mittels Insertion von Human-CD28 cDNA in den pHßAPr-1-neo Vector nach Excision des SalI-HindIII Fragments und Herstellung von Protoplasten aus Escherichia coli (MC1061), welche das Plasmid tragen, b) Fusionierung der Protoplasten mit Maus A20J und/oder L929 Tumorzellen mittels Polyethylenglykol, c)

Kultivierung der in Stufe b erhaltenen transfektierten Zellen, d) Screenen der transfektierten Maus A20J und/oder L929 Zellen auf die Expression von Human CD28 und Selektion von Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen, e) Immunisierung von BALB/c Mäusen mit den Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen (beispielsweise durch Injektionen  $6 \times i.p.$  und anschließend  $1 \times i.v.$ ), f) Entnahme von Milzzellen der so immunisierten Mäuse und Fusionierung der Milzzellen mit ("nonproducer"-, d.h. keine Antikörper produzierenden) Zellen der Zelllinie X63-Ag 8.653 mittels Polyethylenglykol, g) Selektierung der so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe, daß im Überstand selektierter Hybridomzellen Antikörper enthalten sind, die an Human CD28 exprimierende Maus A20J und/oder L929 Zellen binden und h) Kultivierung/Subclonierung der in Stufe g erhaltenen selektierten Hybridomzellen. Anstelle der Stufen a) bis d) können selbstverständlich aber auch andere dem Fachmann geläufige Expressionssysteme eingesetzt werden. Human-CD28 cDNA ist frei erhältlich von Dr. A Aruffo und Dr. B. Seed, die die Sequenz und auch folgende Literaturstelle veröffentlicht haben: Aruffo, A., and Seed, B, 1987, "Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high efficiency COS cell expression system", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 8573. Dieser Literaturstelle ist daher im einzelnen die Herstellung der Human-CD28 cDNA entnehmbar. Darüberhinaus kann unschwer jeder Fachmann mit Hilfe der in der Genbank deponierten Sequenz und der Polymerasekettenreaktion sehr einfach und schnell einen Human-CD28 cDNA Klon herstellen. Der pHßAPr-1-neo Vector ist frei erhältlich von den Autoren der Literaturstelle Gunning, P. et al., 1987, "A human  $\beta$ -actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 4831. "neo" steht dabei für Neomycin-Resistenz. Die Stufe c) wird daher in Anwesenheit von Neomycin durchgeführt. Die vorstehend angesprochenen Zelllinien und/oder Mikroorganismen sind frei verfügbar und käuflich erwerbbar bei der American Type Culture Collection (ATCC). Bezüglich Escherichia coli (MC1061) wird ergänzend auf die Literaturstelle Meissner, P.S., et al., 1987, "Bacteriophage gamma cloning system for the construction of directional cDNA libraries", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 4171, verwiesen.

Gegenstand der Erfindung sind demnach auch gemäß Patentanspruch 4 Hybridomzellen sowie ein Verfahren zur Herstellung von erfindungsgemäßen Antikörpern gemäß der Patentansprüche 5 und 6.

Von eigenständiger Bedeutung ist aber im Rahmen der Erfindung die Verwendung von erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpern zur Herstellung von Arzneimitteln, insbesondere zur Behandlung von Erkrankungen mit pathologisch erniedrigten CD4-T-Zellzahlen, wie AIDS oder bei Stammzelltransplantation nach Chemotherapie von leukämischen Erkrankungen, zur Potenzierung und/oder qualitativen Beeinflussung von Immunreaktionen bei Schutzimpfungen und/oder zur Beeinflussung der Qualität der T-Zellreaktion, insbesondere zur Beeinflussung der Produktion verschiedener Effektormoleküle, beispielsweise Zytokine, bei beispielsweise Autoimmunerkrankungen. Die galenische Herrichtung der Arzneimittel für die verschiedenen Verabreichungsformen ist dem Fachmann gut bekannt und braucht hier nicht näher erläutert zu werden. Als Qualität der T-Zellreaktion ist insbesondere die Produktion bestimmter Zytokinmuster zu verstehen, die z. B. pro- oder anti-inflammatorisch wirksam sein können oder selektiv zur Produktion bestimmter Immunglobulinklassen in B-Lymphozyten führen können (klassische Beispiele für verschiedene Qualitäten der T-Zellreaktion sind die funktionellen TH1

und TH2 Phänotypen, wie in Beispiel 3 beschrieben).

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert. In diesen Ausführungsbeispielen werden insbesondere Screeningverfahren im einzelnen präsentiert, mit welchen erfindungsgemäße monoklonale Antikörper bzw. zugrundeliegende Hybridomzellen selektiert werden können. Die Screeningverfahren werden dabei aus Gründen der Einfachheit und zur Demonstration der Verifizierbarkeit an Tiermodellen beschrieben, weshalb mit an sich bekannten monoklonalen Antikörpern (JJ 316), welche aus einer Immunisierung mit Ratten-CD28 exprimierenden Zellen herrühren, gearbeitet wird, die aufgrund der Tiermodelle im Gegensatz zu erfindungsgemäßen Antikörpern Maus-anti-Ratte Antikörper sind und folglich spezifisch gegen Ratten-CD28 sind. Entsprechende Screeningverfahren lassen sich jedoch für erfindungsgemäße monoklonale Antikörper ohne weiteres durch Austausch der Ratten-CD28 exprimierenden Immunisierungszellen gegen Human-CD28 exprimierende nicht-T-Zellen und ggf. durch Humanisierung auf übliche Weise und auf ganz analogem Wege durchführen. Aus den folgenden Beispielen werden auch erfindungsgemäße therapeutische Einsatzmöglichkeiten deutlich.

Die dargestellten Experimente wurden im Tiermodell der Ratte durchgeführt, wobei als Beispiel für einen "klassischen" CD28-spezifischen Antikörper der monoklonale Antikörper JJ319 und als Beispiel für einen "direkt" aktivierenden der monoklonale Antikörper JJ316 eingesetzt wird. Beide Antikörper sind frei verfügbar und käuflich erwerbbar von der Firma Pharmingen, San Diego, USA. JJ319 und JJ316 Antikörper sind im übrigen erhältlich gemäß der Literaturstelle M. Tacke et al., Immunology, 1995, 154: 5121-5127, auf welche hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird, auch im Hinblick auf übliche Details der Herstellung von Hybridomzellen und monoklonalen Antikörpern.

#### Beispiel 1

Fig. 1 zeigt die proliferative Antwort ungetrennter Lymphknotenzellen der Ratte auf den "direkt" stimulierenden CD28-spezifischen monoklonalen Antikörper (JJ316) und das Ausbleiben einer solchen Antwort bei Einsatz eines "klassischen" CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpers (JJ319). Die Zellen wurden zwei Tage lang in 0,2 ml Medium (RPMI 1640, erhältlich von GIBCO/BRL, enthaltend 5% FCS [fetal calf serum]) in An- oder Abwesenheit der angegebenen Zusätze bei einer Dichte von 1 Mio. Zellen pro ml im begasten Brutschrank kultiviert. Die Zellteilungsaktivität wurde durch den Einbau radioaktiv markierten Thymidins (1  $\mu$ Ci/Ansatz für 16 Std., 1Ci = 37GBq, Bestimmung mit  $\beta$ -Detektor) bestimmt.

Im Gegensatz zu veröffentlichten Resultaten (Siefken et al., Cellular Immunology, 1997, 176: 59-65) zeigt dieses Ergebnis, daß es für die T-Zell-Aktivierung durch direkt aktivierende CD28-spezifische monoklonale Antikörper nicht notwendig ist, diese artifiziell durch einen zweiten Antikörper miteinander zu vernetzen. Vielmehr reicht die Anwesenheit von nicht-T-Zellen aus lymphoiden Organen, nämlich von B-Lymphozyten und sogenannten akzessorischen Zellen, um eine direkte Aktivierung durch löslich zugegebene CD28-spezifische monoklonale Antikörper zu ermöglichen. Wahrscheinlich geschieht dies durch Bindung der monoklonalen Antikörper an sogenannte Fc-Rezeptoren dieser nicht-T-Zellen. Dieses Ergebnis ist eine wichtige Voraussetzung für den therapeutischen Einsatz "direkt" stimulierender CD28-spezifischer monoklonaler Antikörper, in dem eine artifizielle Vernetzung mit anti-Immunglobulin Antikörpern im Gesamtorganismus nicht praktikabel ist.

#### Beispiel 2

"Direkt" aktivierende CD28-spezifische monoklonale Antikörper führen zu einer Erhöhung der CD4 T-Zellzahl im intakten Organismus. Fig. 2 zeigt dies für Lymphknoten der Ratte, die am Tag 0 1 mg des "direkt" stimulierenden CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpers (JJ316) oder des "klassischen" CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpers (JJ319) erhalten hatten. Mit erfindungsgemäßen direkt aktivierenden monoklonalen Antikörpern mit Spezifität für Human-CD28, und deren Fähigkeit, die Vermehrung von T-Lymphozyten zu stimulieren, werden ganz analoge Effekte erreicht. Dies kann dann insbesondere in Situationen Anwendung finden, in denen der Anteil von CD4 T-Zellen pathologisch erniedrigt ist und dem Normalniveau wieder angenähert werden soll. Solche Situationen sind insbesondere im Krankheitsbild von AIDS und nach Chemotherapie und Knochenmarkstransplantation gegeben. Im vorliegenden Beispiel ist die CD4 T-Zellzahl nur vorübergehend erhöht; das liegt daran, daß gesunde Tiere mit normalen CD4 T-Zellzahlen behandelt wurden. Die aufgrund der Proliferationsstimulierung "überschüssigen" Zellen werden durch homöostatische Mechanismen abgebaut.

#### Beispiel 3

Direkt aktivierende CD28-spezifische monoklonale Antikörper sind therapeutisch einsetzbar, z. B. zur Verhinderung einer inflammatorischen Autoimmunreaktion. Fig. 3 zeigt ein Experiment zur sogenannten Adjuvans Arthritis in der Ratte, einem Modellsystem für bestimmte Formen der rheumatoiden Arthritis beim Menschen. "Paw volume increase" gibt die Zunahme des Volumens der Pfoten an. "Days" steht für Tage. "Healthy"-Datenpunkte geben Werte für gesunde Tiere an. Zur Isotyp-Kontrolle wurde ein monoklonaler Antikörper der gleichen Immunglobulinklasse mit Spezifität für ein irrelevantes menschliches Zelloberflächenmolekül verwendet. AA steht für Adjuvans Arthritis. PBS steht für "phosphate buffered saline". W3/25 steht für einen monoklonalen Antikörper mit Spezifität für das CD4 Molekül der Ratte. Die Adjuvans Arthritis wird durch sogenannte TH1-Zellen vermittelt. TH1-Zellen entstehen aus ruhenden CD4 T-Zellen im Verlauf der Aktivierung unter dem Einfluß bestimmter löslicher Faktoren des Immunsystems, sogenannten Zytokine. Die Gegenspieler der TH1-Zellen sind die anti-inflammatorisch wirkenden TH2-Zellen, deren Entstehung durch andere Zytokine gesteuert wird. Bei dem in Fig. 3 und 4 gezeigten Versuch wurde die Entstehung der Adjuvans Arthritis, abgelesen an der Gelenkschwellung (Fig. 3) und dem arthritischen Index (Fig. 4) nach Immunisierung mit Mykobakterien in Adjuvans, durch den "direkt" aktivierenden CD28-spezifischen monoklonalen Antikörper JJ316 fast vollständig unterdrückt. Der "klassische" CD28-spezifische monoklonale Antikörper (JJ319) hatte den gegenteiligen Effekt, d. h. er verschlechterte das Krankheitsbild. Daraus ist erkennbar, auch zur Anwendung beim Menschen, daß durch die Applikation konventioneller bzw. erfindungsgemäßer "direkt" stimulierender CD28-spezifischer monoklonaler Antikörper die Immunreaktion beeinflusst werden kann, hier im Sinne einer "Immundelevation" zu TH1 bzw. TH2. Mit anderen Worten ausgedrückt, können erfindungsgemäße monoklonale Antikörper, aber auch "klassische" monoklonale Antikörper, die für Human-CD28 spezifisch sind (und/oder durch Immunisierung mit T-Zellen erhältlich sind) eine Immunmodulation bewirken. Ein solcher Einsatzzweck "klassischer" monoklonaler Antikörper ist ebenfalls nicht bekannt.

Daher betrifft die Erfindung schließlich auch die Verwen-

derung von gegen Human-CD28 spezifischen monoklonalen Antikörpern (erhältlich nach vorstehenden grundsätzlichen Verfahrensweisen, bei Immunisierung mit Human-CD28 exprimierenden T-Zelllinien oder nicht-T-Zelllinien) zur Herstellung von Arzneimitteln zur Modulation von Immunreaktionen, und zwar Immunsuppression (beispielsweise mit Human-CD28 Analogen zu JJ319) oder Immunverstärkung (beispielsweise mit Human-CD28 Analogen zu JJ316).

#### Patentansprüche

1. Humanverträgliche monoklonale Antikörper, welche für Human-CD28 spezifisch sind und Human-T-Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der Human-T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktivieren.
2. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 1, die erhältlich sind durch
  - A) Herstellung von zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörpern befähigten Hybridomzellen im Wege einer Immunisierung mit nicht-T-Tumorzelllinien, auf welchen Human-CD28 exprimiert ist,
  - B) ggf. Humanisierung der aus Hybridomzellen gemäß Stufe A erhältlichen monoklonalen Tier-Antikörper durch biochemischen oder gentechnologischen Austausch konstanter Komponenten der Tierantikörper gegen analoge konstante Komponenten eines menschlichen Antikörpers bzw. Austausch den Komponenten entsprechender Gene der Hybridomzellen,
  - C) Sezernierung der monoklonalen Antikörper in Hybridomzell-Kulturen und Isolierung der monoklonalen Antikörper daraus oder Produktion der monoklonalen Antikörper durch Injektion der Hybridomzellen in Tiere, beispielsweise Mäuse, und Isolierung der monoklonalen Antikörper aus der Körperflüssigkeit der Tiere.
3. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, wobei die zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörpern befähigten Hybridomzellen erhältlich sind durch
  - a) Schaffung eines Plasmids mittels Insertion von Human-CD28 cDNA in den pHβAPr-1-neo Vector nach Excision des SalI-HindIII Fragments und Herstellung von Protoplasten aus Escherichia coli (MC1061), welche das Plasmid tragen,
  - b) Fusionierung der Protoplasten mit Maus A20J und/oder L929 Tumorzellen mittels Polyethylenglykol,
  - c) Kultivierung der in Stufe b erhaltenen transfektierten Zellen,
  - d) Screenen der transfektierten Maus A20J und/oder L929 Zellen auf die Expression von Human-CD28 und Selektion von Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen,
  - e) Immunisierung von BALB/c Mäusen mit den Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen,
  - f) Entnahme von Milzzellen der so immunisierten Mäuse und Fusionierung der Milzzellen mit Zellen der Zelllinie X63-Ag 8.653 mittels Polyethylenglykol,
  - g) Selektierung der so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe, daß im Überstand selektierter Hybridomzellen Antikörper enthalten sind, die an Human-CD28 exprimierende Maus A20J und/oder L929 Zellen binden und

- h) Kultivierung/Subclonierung der in Stufe g erhaltenen selektierten Hybridomzellen.
4. Hybridomzellen zur Herstellung von monoklonalen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 3, die durch folgende Verfahrensschritte erhältlich sind:
  - a) Schaffung eines Plasmids mittels Insertion von Human-CD28 cDNA in den pHβAPr-1-neo Vector nach Excision des SalI-HindIII Fragments und Herstellung von Protoplasten aus Escherichia coli (MC1061), welche das Plasmid tragen,
  - b) Fusionierung der Protoplasten mit Maus A20J und/oder L929 Tumorzellen mittels Polyethylenglykol,
  - c) Kultivierung der in Stufe b erhaltenen transfektierten Zellen,
  - d) Screenen der transfektierten Maus A20J und/oder L929 Zellen auf die Expression von Human-CD28 und Selektion von Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen,
  - e) Immunisierung von BALB/c Mäusen mit den Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen,
  - f) Entnahme von Milzzellen der so immunisierten Mäuse und Fusionierung der Milzzellen mit Zellen der Zelllinie X63-Ag 8.653 mittels Polyethylenglykol und
  - g) Selektierung der so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe, daß im Überstand selektierter Hybridomzellen Antikörper enthalten sind, die an Human-CD28 exprimierende Maus A20J und/oder L929 binden.
5. Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern nach einem der Ansprüche 1 bis 3 mit folgenden Verfahrensstufen:
  - A) Herstellung von zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörpern befähigten Hybridomzellen im Wege einer Immunisierung mit nicht-T-Tumorzelllinien, auf welchen Human-CD28 exprimiert ist,
  - B) ggf. Humanisierung der aus Hybridomzellen gemäß Stufe A erhältlichen monoklonalen Tier-Antikörper durch biochemischen oder gentechnologischen Austausch konstanter Komponenten der Tierantikörper gegen analoge konstante Komponenten eines menschlichen Antikörpers bzw. Austausch den Komponenten entsprechender Gene der Hybridomzellen,
  - C) Sezernierung der monoklonalen Antikörper in Hybridomzellen-Kulturen und Isolierung der monoklonalen Antikörper daraus oder Produktion der monoklonalen Antikörper durch Injektion der Hybridomzellen in Tiere, beispielsweise Mäuse, und Isolierung der monoklonalen Antikörper aus der Körperflüssigkeit der Tiere.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörper befähigten Hybridomzellen in folgenden Verfahrensstufen hergestellt werden:
  - a) Schaffung eines Plasmids mittels Insertion von Human-CD28 cDNA in den pHβAPr-1-neo Vector nach Excision des SalI-HindIII Fragments und Herstellung von Protoplasten aus Escherichia coli (MC1061), welche das Plasmid tragen,
  - b) Fusionierung der Protoplasten mit Maus A20J und/oder L929 Tumorzellen mittels Polyethylenglykol,
  - c) Kultivierung der in Stufe b erhaltenen transfektierten Zellen,

- d) Screenen der transfektierten Maus A20J und/oder L929 Zellen auf die Expression von Human-CD28 und Selektion von Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen,
- e) Immunisierung von BALB/c Mäusen mit den Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen. 5
- f) Entnahme von Milzzellen der so immunisierten Mäuse und Fusionierung der Milzzellen mit Zellen der Zelllinie X63-Ag 8.653 mittels Polyethylenglykol und 10
- g) Selektierung der so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe, daß im Überstand selektierter Hybridomzellen Antikörper enthalten sind, die an Human-CD28 exprimierende Maus A20J und/oder L929 Zellen binden. 15
7. Verwendung von monoklonalen Antikörpern nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung eines Arzneimittels zur therapeutischen Behandlung des menschlichen Körpers. 20
8. Verwendung nach Anspruch 7 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Erkrankungen mit pathologisch erniedrigten CD4-T-Zellzahlen, insbesondere AIDS oder nach Stammzelltransplantation nach Chemotherapie von leukämischen Erkrankungen. 25
9. Verwendung nach Anspruch 7 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Potenzierung und/oder qualitativen Beeinflussung von Immunreaktionen bei Schutzimpfungen.
10. Verwendung nach Anspruch 7 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Beeinflussung der Qualität der T-Zellreaktion, insbesondere zur Beeinflussung der Produktion verschiedener Effektormoleküle, beispielsweise Zytokine, bei beispielsweise Autoimmunerkrankungen. 30 35

---

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

---

40

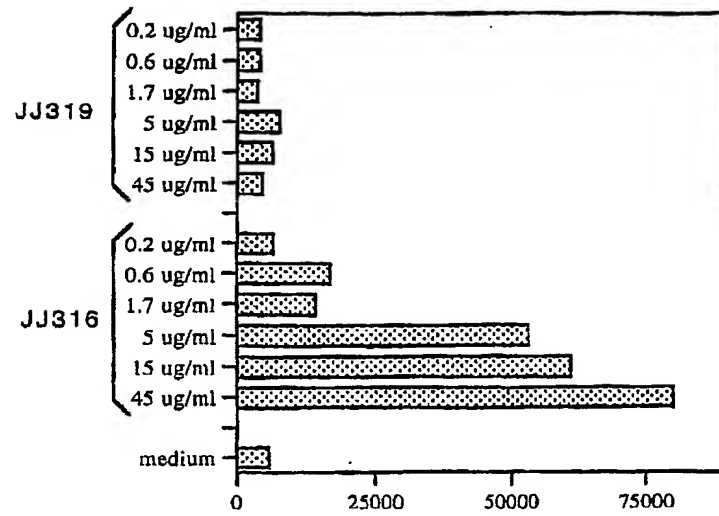
45

50

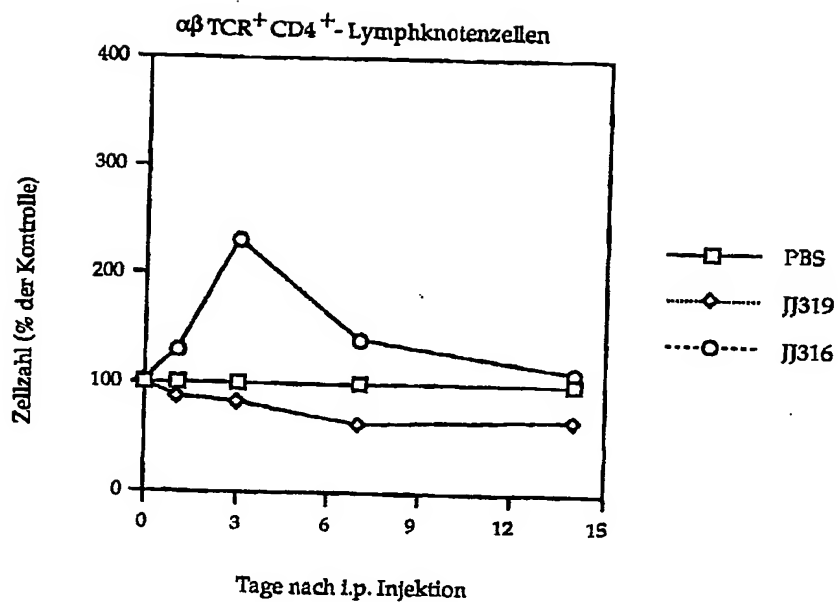
55

60

65



**FIG. 1**



**FIG. 2**



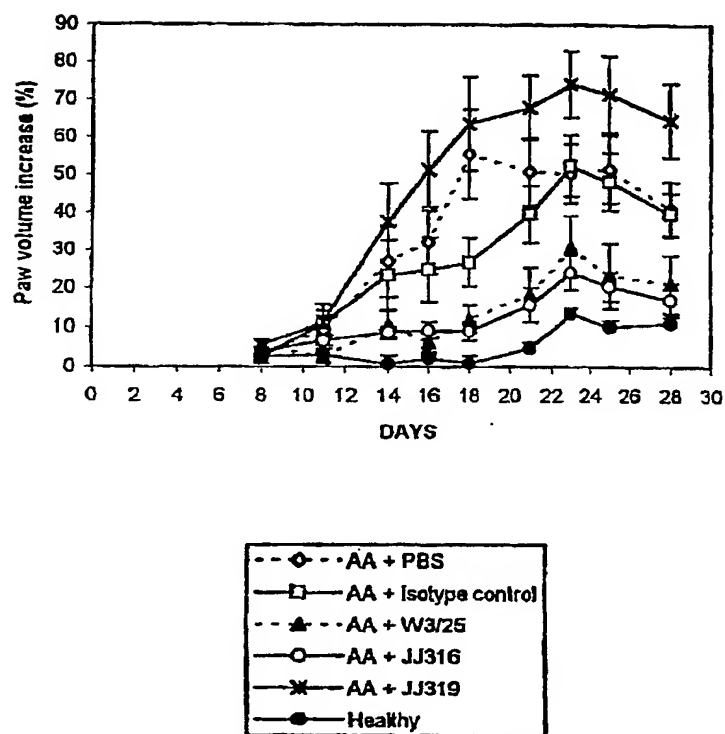


FIG. 3

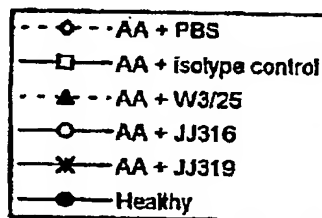
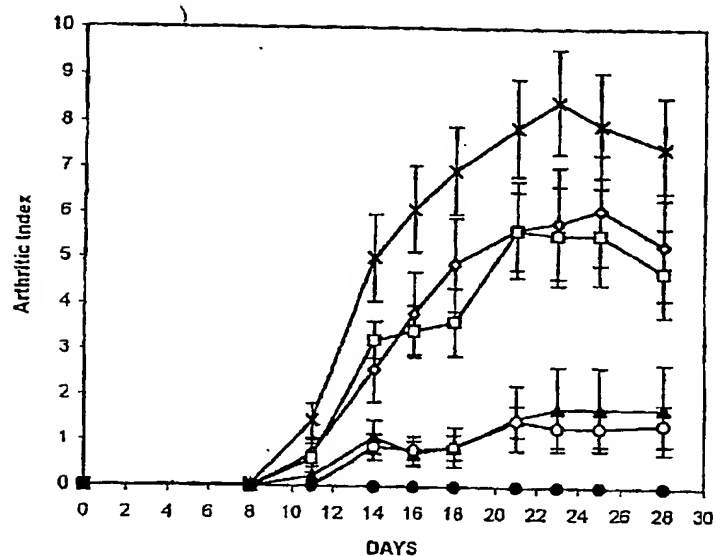


FIG. 4